# UNTERSUCHUNGEN ZUR NATUR DER WÄHREND DES OXIDATIVEN METABOLISMUS VON N, N-DIMETHYLANILIN DURCH PARTIELL SOLUBILISIERTES CYTOCHROM p-450 GEBILDETEN SPEKTRALEN KOMPLEXE

Gerda AICHINGER

1901

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. W. Forth

# UNTERSUCHUNGEN ZUR NATUR DER WÄHREND DES OXIDATIVEN METABOLISMUS VON N,N-DIMETHYLANILIN DURCH PARTIELL SOLUBILISIERTES CYTOCHROM P-450 GEBILDETEN SPEKTRALEN KOMPLEXE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gerda Aichinger
aus
München
1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Hlavica

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. W. Forth

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.6.1981

UNIV. LEIDEN BIBL.

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet.

# Inhaltsübersicht


A. Einleitung Seite

1. Bedeutung und Wirkungsweise mischfunktioneller Monooxygenasen 1
2. Vorkommen, physiko-chemische Eigenschaften und Funktion des Cytochrom P-450 Systems 3
3. Die Bedeutung spektraler Änderungen nach Zusatz verschiedener Substrate zu Mikrosomensuspensionen 6

B. Materialien und Methoden

1. Chemische Substanzen 8
2. Präparation der Mikrosomenfraktion 9
3. Enzyminduktion 10
4. Extraktion der Mikrosomenfraktionen mit organischen Lösungsmitteln 11
5. Partielle Anreicherung von Cytochrom P-450 11
6. Präparation der Liposomenfraktion 13
7. Messung der Differenzspektren 13
8. Enzymatische Ansätze und analytische Methoden 14

C. Ergebnisse Seite

1. Die Bildung spektraler Komplexe während des oxidativen Metabolismus von N,N-Dimethylanilin durch partiell solubilisiertes Cytochrom P-450 17

2. Differenzspektren möglicher Metabolite des N,N-Dimethylanilins 21

3. Abhängigkeit der Bildungsgeschwindigkeit der Cytochrom P-450-Produkt-Addukte und der enzymatischen C- und N-Oxygenierung von N,N-Dimethylanilin von der Temperatur 23

4. Beeinflussung der Bildung der Cytochrom P-450-Produkt-Addukte und der enzymatischen C- und N-Oxygenierung von N,N-Dimethylanilin durch Vorbehandlung der mischfunktionellen Oxygenase mit organischen Lösungsmitteln 24

5. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Bildung der Cytochrom P-450-Produkt-Addukte 26

6. Der Einfluß von n-Octylamin auf die Bildung der Cytochrom P-450-Produkt-Addukte und die Geschwindigkeit der enzymatischen C- und N-Oxygenierung des N,N-Dimethylanilins 27

Seite

7. Einfluß der Enzyminduktion auf die Bildung der Cytochrom P-450-Produkt-Addukte und die enzymatische C- und N-Oxygenierung von N,N-Dimethylanilin 28

D. Diskussion 42

E. Zusammenfassung 46

F. Literaturverzeichnis 47

# A. Einleitung

## 1. Bedeutung und Wirkungsweise mischfunktioneller Monooxygenasen

Viele im Zellmetabolismus bedeutsame Substrate haben hydrophilen Charakter, und können daher zahlreiche chemische Reaktionen eingehen. Hydrophobe Stoffe, zu denen Lipide, Steroidhormone, Vitamine, aber auch körperfremde Verbindungen gehören, können über aromatische und alicyklische Ringsysteme, sowie aliphatische Seitenketten verfügen, die einer metabolischen Umwandlung widerstehen. Derartige Substanzen werden von bestimmten Enzymen, den Monooxygenasen, angegriffen.

Monooxygenasen benötigen zur Einführung eines Sauerstoffatoms in das Substrat molekularen Sauerstoff und einen Elektronendonator (Mason, 1957). Die allgemeine Reaktionsgleichung derartiger mischfunktioneller Oxygenierungsreaktionen lautet:

$$RH + O_2 + DH_2 \longrightarrow ROH + H_2O + D \quad ,$$

wobei RH das Substrat, $DH_2$ und D den Elektronendonator im reduzierten bzw. oxidierten Zustand darstellen.

Die Umwandlung hydrophober körperfremder Stoffe in hydrophile, und daher eliminierbare Verbindungen, ist deshalb von besonderer Bedeutung, weil körperfremde Verbindungen wie Zusätze zu Nahrungsmitteln, Pharmaka und andere Chemikalien mit zum Teil mutagenen oder kanzerogenen Eigenschaften über Nahrung, Atmung und die Haut in den menschlichen Organismus gelangen. Die Biotransformation derartiger Substanzen durch mischfunktionelle Oxygenasen kann zu einer Entgiftung dieser Stoffe führen; andererseits kann durch metabolische Umwandlung aber auch Giftung erfolgen (Grein et al., 1975). So wurde festgestellt, daß aromatische Amine erst nach Umwandlung zu Arylhydroxylaminen karzinogene oder mutagene Wirkungen entfalten (Miller et al., 1961; Boyland et al., 1963; Kriek, 1965).

Unter den an der Biotransformation körpereigener und körperfremder Stoffe beteiligten Monooxygenasen nimmt das Cytochrom P-450 System eine besondere Stellung ein. Seine physiologische Bedeutung liegt in der Beteiligung an Biosynthese und Abbau von Steroidhormonen (Gilette, 1966; Conney, 1967). Die Funktion dieses Enzymsystems soll im folgenden näher beschrieben werden.

## 2. Vorkommen, physiko-chemische Eigenschaften und Funktion des Cytochrom P-450-Systems

1958 entdeckten Klingenberg und Garfinkel unabhängig voneinander in Ratten- und Schweinelebermikrosomen ein neues CO-bindendes Pigment, welches sich durch die ungewöhnliche Lage der Soret-Bande des CO-Addukts bei 450 nm auszeichnete (Klingenberg, 1958; Garfinkel, 1958). Untersuchungen von Omura und Sato (1964) zeigten, daß es sich um ein Hämoprotein des b-Typs handelt. Es wurde in der mikrosomalen Fraktion verschiedener Säugetierorgane wie Leber (Klingenberg, 1958; Garfinkel, 1958), Niere (Ellin, 1972), Dünndarm (Takesue und Sato, 1968) und Nebennierenrinde (Estabrook et al., 1963) nachgewiesen. Sein Vorkommen in Vögeln, Reptilien, Amphibien (Schrittmatter und Umberger, 1969), Insekten (Morello et al., 1971), Pflanzen (Rich und Bendall, 1975), Bakterien (Katagiri et al., 1968) und Hefen (Duppel et al., 1973) ist gesichert. Untersuchungen zur Natur des Elektronentransports in der mikrosomalen Membran ergaben, daß ein in die Membran integriertes Flavoprotein, die NADPH-Cytochrom c(P-450)Reduktase, Elektronen auf Cytochrom P-450 überträgt. Antikörper gegen NADPH-Cytochrom c Reduktase hemmen daher eine Vielzahl Cytochrom P-450 abhängiger Substrathydroxylierungen (Lu und Coon, 1968). Die Übertragung von Elektronen von NADPH auf

Cytochrom P-450 ist eng an die Anwesenheit einer Lipidkomponente geknüpft, deren chemische Natur als Phosphatidylcholin erkannt wurde (Strobel et al., 1970). In den Mitochondrien der Nebennierenrinde wurde ferner als Mediator zwischen NADPH-Cytochrom c Reduktase und Cytochrom P-450 eine eisenhaltige, hämfreie Proteinkomponente, das Adrenodoxin, entdeckt (Omura et al., 1966). Eine analoge Komponente in der mikrosomalen Elektronentransportkette ist jedoch nicht bekannt. Durch Rekombination von solubilisiertem Cytochrom P-450, NADPH-Cytochrom c Reduktase und Lipidfaktor gelang es Lu und Coon (1968) volle enzymatische Aktivität in Bezug auf verschiedene Substrathydroxylierungen zu erzielen. Die zur Substrathydroxylierung führenden Einzelschritte sind in Fig. 1 dargestellt: Das zu oxygenierende Substrat geht mit Ferricytochrom P-450 eine reversible Bindung ein. Nach Bildung des Enzym-Substratkomplexes wird das Hämoprotein durch Einführung eines Elektrons in Ferrocytochrom P-450 übergeführt, welches molekularen Sauerstoff zu binden vermag. Unterschiedliche Substrate können die Reduktionsgeschwindigkeit des Hämoproteins sowohl beschleunigen als auch verlangsamen (Kupfer und Orrenius, 1970; Hildebrandt et al., 1968). Der ternäre Komplex aus Enzym, Substrat und molekularem Sauerstoff, welcher auch spektral nachgewiesen werden

konnte (Estabrook et al., 1971), nimmt nun ein weiteres Elektron auf, welches in der Regel ebenfalls mittels NADPH-Cytochrom c Reduktase übertragen wird. Anschließend wird eines der beiden Sauerstoffatome in das Substratmolekül eingeführt, das andere zu $H_2O$ reduziert. Das oxygenierte Substrat wird entbunden.

Das hier skizzierte hydroxylierende Enzymsystem ist relativ unspezifisch. Es wurden verschiedene Formen von Cytochrom P-450 mit bestimmten spektralen, katalytischen und immunbiologischen Eigenschaften beschrieben. So fand Levin (1975) nach partieller Anreicherung des Pigments aus Lebermikrosomen von mit Phenobarbital oder Methylcholanthren vorbehandelten Tieren vier verschiedene Cytochromspezies. Diese unterscheiden sich sowohl im Absolutspektrum, wie im Differenzspektrum ihrer CO- bzw. Äthylisocyanidaddukte (Levin et al., 1975). Auch Werringloer und Estabrook (1975) gelang durch Anwendung von Inhibitoren des Cytochrom P-450 Systems wie Kohlenmonoxid, Metyrapon und Äthylisocyanid die spektrale Identifizierung von mindestens vier verschiedenen Cytochromformen. Ein weiterer Hinweis für das Vorkommen multipler Formen des Hämoproteins ist die unterschiedliche Hemmbarkeit mischfunktioneller Oxygenierungsreaktionen durch derartige Hemmstoffe (Mansuy et al., 1977; Buenning et al., 1976).

## 3. Die Bedeutung spektraler Änderungen nach Zusatz verschiedener Substrate zu Mikrosomensuspensionen

Die Bildung von Cytochrom P-450-Substratkomplexen läßt sich spektral nachweisen. 1965 beschrieben Narasimhulu et al. die Entwicklung spektraler Änderungen nach Zusatz von 17-Hydroxyprogesteron zu Nebennierenrindenmikrosomen. Gleichzeitig beobachteten auch Imai und Sato (1966) charakteristische Differenzspektren nach Zusatz verschiedener anderer Substrate zu oxidierten Lebermikrosomen. So löst Hexobarbital ein Differenzspektrum mit einem Maximum bei 385 nm und einem Minimum bei 420 nm aus, während Anilin ein Differenzspektrum mit einem Maximum bei 430 nm und einem Minimum bei 390 nm ergibt (Imai und Sato, 1966). Ersteres wurde später als Typ I Spektrum, letzteres als Typ II Spektrum bezeichnet. Gleichartige Spektren konnten auch mit solubilisiertem Cytochrom P-450 erzeugt werden, wodurch der endgültige Nachweis einer Substratbindung an Cytochrom P-450 gelang (Mitanai und Horie, 1969).

Eine große Anzahl nicht stickstoffhaltiger Verbindungen wie Sulfide (Nastainczyk et al., 1975), Thiole (Nastainczyk et al., 1976) und Phosphine (Mansuy et al., 1974) bilden mit reduziertem Cytochrom P-450 ungewöhnliche Differenzspektren mit Maxima zwischen 446 - 470 nm. Stickstoffhaltige

Moleküle wie n-Octylamin (Jefcoate und Gaylor, 1969), Metyrapon (Jonen et al., 1974) und Nitrosoalkane (Mansuy et al., 1977) ergeben nach Bindung an Ferrocytochrom P-450 Differenzspektren mit Absorptionsbanden zwischen 438 - 455 nm.

Kürzlich wurde über die Bildung von Cytochrom P-450-Produktkomplexen während des oxidativen Metabolismus von Piperonylbutoxid (Philpot und Hodgson, 1972) und SKF 525-A (Franklin, 1976) berichtet, welche durch Absorptionsmaxima bei 455 nm charakterisiert sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Natur der im Rahmen enzymchemischer Untersuchungen zur mischfunktionellen Oxygenierung von N,N-Dimethylanilin durch partiell gereinigtes Cytochrom P-450 beobachteten spektralen Änderungen und deren besondere Beziehung zur N-Oxidation dieses Substrats näher zu analysieren; die Beteiligung des Cytochroms an dieser Reaktion wurde durch Arbeiten von Hlavica und Kehl (1974, 1977) wahrscheinlich gemacht. Die Enzymologie der N-Oxidation stickstoffhaltiger Substanzen ist deshalb von besonderem pharmakologischen und toxikologischen Interesse, da bestimmte aromatische Amine durch N-Oxidation in biologisch aktive Metabolite mit mutagenen und kanzerogenen Eigenschaften übergeführt werden können (Miller und Miller, 1964). Arylhydroxylamine sind darüberhinaus wirksame Ferrihämoglobinbildner (Kiese et al., 1950),

und besitzen Affinität zu bestimmten Strukturen in Zellproteinen, wodurch sie den Charakter von Allergenen annehmen können (Gutman und Nagasama, 1960; Gutman und Erickson, 1969).

## B. Materialien und Methoden

### 1. Chemische Substanzen

Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat ($NADP^+$), Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (EC 1.1.1.49) und Katalase (EC 1.11.1.6) waren Produkte von Boehringer, Mannheim.
N-Methylanilin, N,N-Dimethylanilin und n-Octylamin wurden von Merck, Darmstadt, bezogen.
N,N-Dimethylanilin-N-Oxid wurde nach Meisenheimer (1911) dargestellt und als Hydrochlorid umkristallisiert.

## 2. Präparation der Mikrosomenfraktion

Mikrosomenfraktionen wurden aus den Lebern erwachsener männlicher und weiblicher Chinchillakaninchen, die Altromin$^{R}$ Standarddiät und Wasser ad lib. erhielten, präpariert. Die Tiere wurden durch Genickschlag getötet, die Lebern entnommen und unmittelbar bei +4$^{o}$C aufgearbeitet. Hierzu wurde das Lebergewebe nach der Methode von Jagow et al. (1965) zerkleinert und durch ein Sieb von definierter Porengröße gepresst. Um möglichst hämoglobinfreie Präparationen zu erhalten, wurde ein Teil Gewebebrei mit zwei Teilen einer eiskalten 0.15 M KCl-Lösung versetzt, 20 Minuten im Eisbad gerührt, und anschließend 20 Minuten in einer MSE High Speed 18 Zentrifuge bei 9000 x g geschleudert. Das Sediment aus Kernen, Zellmembranen und Mitochondrien wurde verworfen. Der Überstand wurde 60 Minuten bei 78.000 x g in einer Beckman L2 65B Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit 0.15 M KCl-Lösung gewaschen, jeweils 60 Minuten bei 78.000 x g geschleudert, und letztlich in einem kleinen Volumen eines 0.15 M Sörensen Phosphatpuffers, pH 7.4, aufgenommen, homogenisiert und bei +4$^{o}$C aufbewahrt.

3. Enzyminduktion

Junge Kaninchen mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 2,3 kg erhielten an acht aufeinanderfolgenden Tagen eine subkutane Injektion von 50 mg Phenobarbital-Natrium pro kg Körpergewicht; Kontrollen erhielten ein gleiches Volumen einer 0,9%igen (w/v) Kochsalzlösung.

Eine andere Gruppe von Kaninchen erhielt an drei aufeinanderfolgenden Tagen 20 mg Methylcholanthren pro kg Körpergewicht subkutan injiziert; Kontrollen erhielten ein gleiches Volumen Olivenöl. Die Tiere wurden 24 Stunden nach der letzten Gabe getötet; Lebermikrosomen wurden, wie oben beschrieben, präpariert.

4. Extraktion der Mikrosomenfraktionen mit organischen Lösungsmitteln

Gefriergetrocknete Kaninchenlebermikrosomen (250 mg) wurden in 25 ml eiskaltem Butan-1-ol homogeniert und 5 Minuten bei 35.000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 25 ml Butan-1-ol aufgenommen, erneut homogeniert und abermals zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit 25 ml eiskaltem Aceton gewaschen. Die Suspension wurde anschließend auf einem Büchertrichter filtriert. Der puderförmige Rückstand wurde in einem Exsikkator unter Vakuum getrocknet, bei -20°C gelagert und für die partielle Reinigung von Cytochrom P-450 verwendet.

5. Partielle Anreicherung von Cytochrom P-450

Cytochrom P-450 aus unvorbehandelten und vorbehandelten Kaninchenlebermikrosomen wurde nach der Methode von Autor et al. (1973) partiell angereichert. Die Ansätze hatten folgende Zusammensetzung:

| | |
|---|---|
| Mikrosomenprotein | 800 mg |
| 20%ige (v/v) Glycerinlösung | 14 ml |
| 0.1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.7 | 7 ml |
| 0.1 mM Dithiothreitol | 0.7 ml |
| Destilliertes Wasser | ad 65 ml |

Das Gemisch wurde achtmal 20 Sekunden in einem MSE Ultraschallgerät bei voller Leistung im Eisbad beschallt, anschließend mit einer wässrigen Lösung von Natriumcholat zu einem Endvolumen von 70 ml ergänzt und 10 Minuten im Eise gerührt. Der Ansatz wurde 60 Minuten bei 78.000 x g in der Ultrazentrifuge geschleudert. Zu 100 ml des klaren Überstandes wurden langsam unter Rühren 24,2 g festes Ammoniumsulfat hinzugefügt. Das Präzipitat wurde 30 Minuten in der MSE Zentrifuge bei 18.000 x g abgeschleudert. Zu 100 ml des klaren Überstandes wurden weiterhin 7,1 g festes Ammoniumsulfat hinzugefügt. Das nach Abschleudern erhaltene Präzipitat wurde in 15 ml eines 0.1 M Tris-HCl-Puffers, pH 7.7, aufgenommen, welcher 20%iges (v/v) Glycerin und 0.1 mMDithiothreitol enthielt. Die Lösung wurde über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert. Die Enzymlösung wurde anschließend mit Puffer auf 30 ml verdünnt und erneut dreimal 10 Sekunden beschallt. Der Ansatz wurde durch Zusatz von festem Ammoniumsulfat zu 40%iger Sättigung gebracht und das gefällte Protein 60 Minuten bei 78.000 x g abgeschleudert. Nach erneuter Dialyse wurde das partiell solubilisierte Cytochrom letztlich in 0.15 M Phosphatpuffer, pH 7.4, aufgenommen. Durch diesen Anreicherungsprozeß wurde eine etwa zweifache Reinigung des Pigments erzielt. Die Präparationen enthielten noch geringe Mengen an Cytochrom $b_5$ und genügend

NADPH-Cytochrom c Reductase um die C- und N-Oxygenierung von N,N-Dimethylanilin zu unterhalten.

6. Präparation der Liposomenfraktion

Mikrosomale Lipide wurden nach dem Verfahren von Folch et al. (1975) gewonnen. Der Chloroform Methanol Extrakt wurde in einem Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt und bei -20°C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurden 5 mg der Trockensubstanz in 1 ml 0.15 $KH_2PO_4/Na_2HPO_4$, pH 7.4, suspendiert und 30 Sekunden beschallt.

7. Messung der Differenzspektren

Der Standardansatz enthielt:

| | |
|---|---|
| 0.15 M | $KH_2PO_4/Na_2HPO_4$, pH 7.4 , |
| 1.2 mM | $NADP^+$ |
| 10 mM | Glucose-6-phosphat |
| 6 mM | $MgCl_2$ |
| 5 µg | Glucose-6-phosphat Dehydrogenase |
| 4.36 µg | Cytochrom P-450 |

in einem Endvolumen von 2,8 ml.

Nach Schreibung der Basislinie wurde der Probeküvette N,N-Dimethylanilin zu einer Endkonzentration von 1.79 mM zugesetzt, und das Differenzspektrum in einem Cary 118 Spektrophotometer bei 25°C zwischen 380 - 500 nm gemessen. Die Messungen wurden in festgelegten Zeitabständen wiederholt; der optische Lichtweg war 1 cm.

8. Enzymatische Ansätze und analytische Methoden

Die Ansätze zur Messung der enzymatischen C- und N-Oxygenierung von N,N-Dimethylanilin durch Cytochrom P-450 enthielten folgende Komponenten in einem Endvolumen von 3,5 ml:

| | |
|---|---|
| 0.15 M | Phosphatpuffer, pH 7.4 , |
| 1.2 mM | $NADP^+$ |
| 10 mM | Glucose-6-phosphat |
| 6 µg | Glucose-6-phosphat Dehydrogenase |
| 6 mM | $MgCl_2$ |
| 1.43 µM | Cytochrom P-450 |

Die Proben wurden 5 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Danach wurde N,N-Dimethylanilin zu einer Endkonzentration von 1.0 mM zugesetzt, und weitere 10 Minuten inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend mit eiskalter Perchlorsäure (Endkonzentration 0.3 M) enteiweißt.

N,N-Dimethylanilin-N-Oxid wurde nach der Methode von Ziegler und Petit (1964) bestimmt. Hierzu wurde der perchlorsaure Überstand mit 3.3 N NaOH auf pH 9.4 eingestellt, und überschüssiges N,N-Dimethylanilin mit peroxidfreiem Äther erschöpfend extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 3.3 N HCl auf pH 2.5 eingestellt. Nach Zusatz einer frisch bereiteten Lösung von $NaNO_2$ (Endkonzentration 0.9 mM) wurden die Proben 5 Minuten bei 60°C inkubiert und anschließend kurz gekühlt. Die Extinktion der Proben wurde bei 420 nm gegen einen Leerwert gemessen.

Der während der C-Oxygenierung des N,N-Dimethylanilins entstandene Formaldehyd wurde nach Nash (1953) gemessen. Hierzu wurde der perchlorsaure Überstand mit dem gleichen Volumen Nash-Reagens, bestehend aus 2 M Ammoniumacetat, 0.05 M Essigsäure und 0.02 M Acetylaceton, versetzt und 10 Minuten bei 60°C inkubiert. Die Extinktion des gebildeten Lutidinfarbstoffes wurde bei 412 nm gegen einen Leerwert gemessen.

Cytochrom P-450 wurde nach der Methode von Omura und Sato (1964) bestimmt. Ansätze aus Cytochrom P-450 (1 mg Protein/ml Ansatz) in 0.15 M Phosphatpuffer, pH 7.4, wurden gleichmäßig auf zwei Küvetten verteilt. Der Inhalt der Probeküvette wurde 1 Minute mit CO begast. Anschließend wurde Probe- und Referenzansatz durch Zusatz von festem

Natriumdithionit reduziert, und das Differenzspektrum in einem Cary 118 Spektrophotometer zwischen 400 und 500 nm gemessen.

Cytochrom $b_5$ wurde nach Omura und Sato (1964) bestimmt.

NADPH-Cytochrom c Reduktase (EC 1.6.2.4.) wurde nach Masters et al. (1968), Hämoxygenase (EC 1.14.99.3) nach Yoschida und Kikuchi (1974) gemessen.

Der Proteingehalt der Proben wurde mittels der von Gornall et al. (1949) entwickelten, und nach Szarkowska und Klingenberg (1963) modifizierten Biuret-Methode bestimmt.

## C. Ergebnisse

### 1. Die Bildung spektraler Komplexe während des oxidativen Metabolismus von N,N-Dimethylanilin durch partiell solubilisiertes Cytochrom P-450

Fügt man einer aeroben Lösung von mikrosomalen Cytochrom P-450 aus Kaninchenleber in Gegenwart eines NADPH-generierenden Systems N,N-Dimethylanilin hinzu,so resultiert hieraus zunächst ein Differenzspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 410 nm und einem Minimum bei 424 nm (Fig. 2). Die Lage der Soretbande dieses Spektrums weicht von der eines üblichen "Typ I" Spektrums mit Maximum zwischen 382 - 392 nm ab (Estabrook et al., 1973). Wiederholte Messungen des gleichen Ansatzes ergeben eine zeitabhängige Umwandlung dieses "Typ I" Spektrums in ein zweigipfliges Differenzspektrum mit Absorptionsmaxima bei 424 und 448 nm, und Minima bei 400 und 435 nm (Fig. 2). Beide spektralen Komplexe zerfallen unterschiedlich schnell, wobei die 448 nm-Absorptionsbande eine bathochrome Verschiebung erleidet (Fig. 2). Die Kinetik der spektralen Änderungen ist in Fig. 3 dargestellt. Die Entwicklung beider Hämoproteinkomplexe zeigt eine initiale Verzögerungsphase, die durch unterschiedliche Vorbehandlung des Systems beeinflußt werden kann. Obwohl die

Bildung geringer Mengen von Kohlenmonoxid durch Hämabbau die Komplexbildung stören könnte (Franklin, 1977), kann dies das Zustandekommen derartiger Verzögerungsphasen unter unseren Bedingungen nicht erklären, da die partiell gereinigten Hämoproteinpräparationen im wesentlichen frei von Hämoxygenaseaktivität waren.

In gleicher Weise ist die Bildung des 448 nm-Komplexes nicht das Ergebnis der Bindung endogen gebildeten Kohlenmonoxids an reduziertes Cytochrom P-450. Die Richtigkeit dieser Annahme wird durch Versuche mit n-Octylamin gestützt (Fig. 4). So vermag n-Octylamin, ein kompetetiver Antagonist des Kohlenmonoxids (Jefcoate et al., 1969), den 448 nm-Komplex nicht zu dissoziieren. Ferner bewirkt Zusatz von Dithionit zu Probe- und Referenzküvette Löschung der 448 nm-Absorptionsbande, obwohl Reduktion des Hämoproteins die Bildung des CO-Addukts fördern sollte.

Die Bildung der 424 nm-Absorptionsbande ist nicht Folge unvollständiger Reduktion von Cytochrom $b_5$ in der Referenzküvette: Das Verhältnis der scheinbaren Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung für NADPH-abhängige Reduktion von Cytochrom $b_5$ zu der für Reoxidation des Pigments beträgt 13 (Jansson und Schenkman, 1978). Unter unseren

experimentellen Bedingungen (1000-facher Überschuß von NADPH über Cytochrom $b_5$) liegt das Gleichgewicht somit weitgehend auf seiten der reduzierten Form des Cytochroms, zumal der Verarmung an NADPH in den Ansätzen durch Anwendung eines regenerierenden Systems vorgebeugt wird. Ferner vermindert N,N-Dimethylanilin, der Probeküvette zugesetzt, den Anteil an reduziertem Cytochrom $b_5$ in derartigen NADPH-abhängigen Redoxsystemen (Jansson und Schenkman, 1978; Archakov et al., 1975) durch Stimulierung der Übertragung von Elektronen von Cytochrom $b_5$ auf Cytochrom P-450 während des Oxygenierungsvorgangs. Daher wäre unter unseren experimentellen Bedingungen im Differenzspektrum eher ein Absorptionsminimum bei 424 nm zu erwarten. Eine Beteiligung von Cytochrom $b_5$ an der Bildung des 424 nm-Komplexes läßt sich ferner durch Behandlung des Systems mit Deoxycholat ausschließen: Das Detergens beeinflußt die spektralen Eigenschaften von Cytochrom $b_5$ nicht (Lu et al., 1974), während Cytochrom P-450 in die biologisch inaktive P-420 Form übergeführt wird (Ichikawa et al., 1969). Setzt man dem Inhalt der Probe- und Referenzküvette nach maximaler Entwicklung der spektralen Änderungen Natriumdeoxycholat zu , so schwindet die 424 nm-Absorptionsbande (Fig. 5). Andererseits bleibt sie in Anwesenheit eines Überschusses an Natriumdithionit in beiden Küvetten bestehen.

Die 424 nm-Absorptionsbande ist auch nicht Ausdruck einer Komplexbildung mit biologisch inaktivem Cytochrom P-420, da Zugabe von Natriumdeoxycholat zum Reaktionsgemisch nach maximaler Entwicklung der spektralen Änderungen ein Differenzspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 411 nm ergibt (Fig. 5). Ferner liegt das gesamte CO-reaktive Hämoprotein nach Inkubation mit N,N-Dimethylanilin in der Cytochrom P-450 Form vor (siehe Nebenbild in Fig. 5).

Die Bildung der 424- und 448 nm-Absorptionsbande ist in hohem Maße von der Anwesenheit von Sauerstoff und NADPH im Reaktionsgemisch abhängig. So ist N,N-Dimethylanilin nicht in der Lage, unter aeroben Bedingungen in Abwesenheit von NADPH, oder unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von NADPH ein Äthylisocyanid-ähnliches (Nishibayashi et al., 1966) Differenzspektrum zu bilden (siehe Nebenbild in Fig. 2).

Ein weiterer Hinweis auf die mischfunktionelle Natur des Zustandekommens des doppelgipfligen Differenzspektrums besteht in der Unfähigkeit der Katalase, letzteres nennenswert zu beeinflussen (Fig. 2); bei überwiegend peroxidatischem Mechanismus sollte jedoch dies der Fall sein.

Zusammengefaßt legen unsere Ergebnisse nahe, daß die 424- und 448 nm-Absorptionsbanden spektraler Ausdruck von

Cytochrom P-450-Produktkomplexen sind, die während des oxidativen Metabolismus von N,N-Dimethylanilin entstehen. Da die reduzierte Form des Hämoproteins an derartigen Komplexbildungen beteiligt ist, sollte Zugabe eines Oxidationsmittels, wie Kaliumferricyanid, die Absorptionsbanden vermindern. Wie in Fig. 5 dargestellt, hat die Umwandlung von Ferro- in Ferricytochrom P-450 nach maximaler Entwicklung der spektralen Änderungen das Schwinden der 448 nm-Absorptionsbande zur Folge; gleichzeitig nimmt die Höhe der 424 nm-Absorptionsbande zu. Diese Zunahme ist nicht Folge einer inkompletten Oxidation von Cytochrom $b_5$ in der Probeküvette, da sie in Anwesenheit größerer Mengen Natriumdithionits in beiden Küvetten bestehen bleibt.

2. Differenzspektren möglicher Metabolite des N,N-Dimethylanilins

In der Annahme, daß die während des Metabolismus von N,N-Dimethylanilin gebildeten Zwischenprodukte strukturelle Ähnlichkeit mit den entsprechenden Endprodukten besitzen, untersuchten wir die durch Zugabe von N-Methylanilin oder N,N-Dimethylanilin-N-Oxid zu einer Lösung von Cytochrom P-450 und NADPH-generierendem System verursachten Differenzspektren: Beide Verbindungen sind die einzigen aus dem

oxidativen Metabolismus des N,N-Dimethylanilins primär hervorgehenden Metabolite (Willi und Bickel, 1973; Fig. 6).

N-Methylanilin erzeugt ein Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 424 nm, welches über mindestens 60 min beständig ist (Fig. 7). Andererseits verursacht Zusatz von N,N-Dimethylanilin-N-Oxid zu den Inkubationsansätzen zunächst ein Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 440 nm, welches im Verlauf von 20 min nach 447 nm verschoben wird; gleichzeitig scheint ein zweites Maximum bei 424 nm auf (Fig. 7). Letzteres entsteht wahrscheinlich durch Bindung von N-Methylanilin, welches langsam durch N-Dealkylierung des N-Oxids gebildet wird (Willi und Bickel, 1973; Fig. 6). Da N-Methylanilin weiter zu Anilin dealkyliert werden kann, untersuchten wir, welche spektralen Änderungen nach Zugabe von Anilin zu den Reaktionsansätzen entstehen. Das Amin löst zunächst die Bildung eines Absorptionsmaximums bei 429 nm aus, welches allmählich nach 432 nm verschoben wird. Diese Verschiebung ist wahrscheinlich Ausdruck einer metabolischen Umwandlung des Anilins. Die Unfähigkeit des Arylamins, während dessen Metabolismus einen Cytochrom P-450-Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 450 nm zu bilden, steht in Einklang mit Untersuchungen anderer Autoren (Franklin, 1976).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß nach Zusatz von N-Methylanilin oder N,N-Dimethylanilin-N-Oxid zu den Inkubationsansätzen Differenzspektren entstehen, welche Komponenten jenes Differenzspektrums sind, welches während des oxidativen Metabolismus von N,N-Dimethylanilin durch Cytochrom P-450 beobachtet wird.

3. Abhängigkeit der Bildungsgeschwindigkeit der Cytochrom P-450-Produkt-Addukte und der enzymatischen C- und N-Oxygenierung von N,N-Dimethylanilin von der Temperatur

Die initiale Bildungsgeschwindigkeit der 424- und 448 nm-Absorptionsbande wurde in Temperaturbereichen von 16 - 30°C gemessen, In Fig. 8 ist der Logarithmus der initialen Bildungsgeschwindigkeit als Funktion der reziproken Temperatur aufgetragen. Aus diesem Diagramm errechnen sich die Aktivierungsenergien für den 424- und 448 nm-Komplex zu +19,8 bzw. +51,7 kJ $mol^{-1}$.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde gelöstes Cytochrom P-450 bei 37°C verschieden lang vorinkubiert. Mit zunehmender Inkubationsdauer des Cytochroms nahm die Bildung des 448 nm-Produkt-Addukts nach Zusatz von NADPH-generierendem System und N,N-Dimethylanilin zum Reaktionsgemisch stetig ab; die Bildung der 424 nm-Absorptionsbande wurde hingegen kaum beeinflußt (Fig. 9). In ähnlicher Weise

vermindert Hitzebehandlung des Hämoproteins die N-Oxygenierungsaktivität für N,N-Dimethylanilin erheblich, während die C-Oxygenierung des Arylamins nur leicht vermindert wird (Fig. 9).

4. Beeinflussung der Bildung der Cytochrom P-450-Produkt-Addukte und der enzymatischen C- und N-Oxygenierung von N,N-Dimethylanilin durch Vorbehandlung der mischfunktionellen Oxygenase mit organischen Lösungsmitteln

Die Entwicklung spektraler Änderungen während des Metabolismus von N,N-Dimethylanilin durch Cytochrom P-450 welches nach Extraktion von Kaninchenlebermikrosomen mit Butanol und Aceton isoliert wurde, ist in Fig. 3 dargestellt. Unter der Voraussetzung, daß keine Unterschiede in den Extinktionskoeffizienten der spektralen Komplexe zwischen unbehandelten und mit organischen Lösungsmitteln behandelten Präparationen bestehen, scheint Extraktion der Enzympräparate die Geschwindigkeit der Bildung des 424 nm-Komplexes nicht zu beeinflussen, während die Bildung des 448 nm-Produkt-Addukts nahezu vollständig unterdrückt wird. Da N,N-Dimethylanilin in gleichem Maße an unbehandelte, wie an mit organischen Lösungsmitteln extrahierte Hämoproteinpräparationen gebunden wird, muß angenommen werden, daß die stark verminderte Ferrohämochrombildung

auf eine durch Lipidverlust verursachte Hemmung des Elektronenflusses von NADPH auf Cytochrom P-450 zurückzuführen ist (Vore et al., 1974; Strobel et al., 1970). Durch Lipidzusatz wird die Bildung des 448 nm-Komplexes dementsprechend teilweise wiederhergestellt (Fig. 3).

Extraktion der Enzympräparationen mit organischen Lösungsmitteln scheint die maximale Extinktion des 424 nm-Komplexes zu steigern (Fig. 3). Ähnliches wurde für die Bindung von Benzamphetamin an extrahierte Lebermikrosomen berichtet (Vore et al., 1974). Wahrscheinlich befreit Extraktion das Enzym von endogenen Substraten, sodaß mehr freie Oxygenase zur Bindung von N,N-Dimethylanilin zur Verfügung steht.

Die Auswirkung der Extraktion der Enzympräparationen mit organischen Lösungsmitteln auf die spektralen Charakteristika ist mit analogen Änderungen im Ausmaß der metabolischen C- und N-Oxygenierung des N,N-Dimethylanilins verbunden. So zeigen vorbehandelte Enzympräparationen eine um lediglich 27% verminderte Aktivität für C-Oxygenierung des Amins, während die Geschwindigkeit der N-Oxygenierung um 74% gegenüber den Kontrollen vermindert ist (Tabelle I).

## 5. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Bildung der Cytochrom P-450-Produkt-Addukte

Die Ähnlichkeit des während des oxidativen Metabolismus von N,N-Dimethylanilin durch Cytochrom P-450 beobachteten Differenzspektrums mit jenem, welches pH-abhängig nach Zusatz von Äthylisocyanid zu Lebermikrosomen entsteht, war Anlaß den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Bildung des 424- und 448 nm-Komplexes zu untersuchen.

Wenn die mikrosomale Oxygenierung des N,N-Dimethylanilins bei pH 8.5 abläuft, ist die Absorption der entstehenden Intermediärkomplexe bei 448 nm geringer als bei 424 nm (Fig. 10). Bei pH 6.3 wird die Bildung beider spektraler Komplexe weitgehend unterdrückt (Fig. 10). Im untersuchten pH-Bereich ergibt sich kein spektraler Äquivalenzpunkt. Diese Befunde weichen von Untersuchungsergebnissen zur Bindung von Äthylisocyanid an Cytochrom P-450 ab (Peisach und Mannering, 1975). Die Bildung des 424- bzw. 448 nm-Komplexes beruht daher wahrscheinlich nicht auf einer einfachen, pH-abhängigen Verschiebung des Gleichgewichts zwischen beiden spektralen Spezies. Die pH-Aktivitätskurven der Adduktbildungen gleichen eher jenen für die C- und N-Oxygenierung des N,N-Dimethylanilins durch Kaninchenlebermikrosomen gemessenen (Devereux und Fouts, 1974).

## 6. Der Einfluß von n-Octylamin auf die Bildung der Cytochrom P-450-Produkt-Addukte und die Geschwindigkeit der enzymatischen C- und N-Oxygenierung des N,N-Dimethylanilins

n-Octylamin wird an Dithionit-reduziertes Cytochrom P-450 unter Bildung eines Differenzspektrums mit zwei Soretbanden bei 428 und 448 nm gebunden (Jefcoate und Gaylor, 1969). Es war deshalb von Interesse zu untersuchen, ob n-Octylamin die Bildung des 424- und 448 nm-Cytochrom P-450-Produkt-Addukts des N,N-Dimethylanilins beeinflussen kann.

Zusatz von n-Octylamin zu den Inkubationsansätzen in Probe- und Referenzküvette verdoppelt nahezu die N,N-Dimethylanilin-abhängige Bildungsgeschwindigkeit des 424 nm-Komplexes; die Zerfallsgeschwindigkeit dieses Komplexes wird ebenfalls erheblich gesteigert (Fig. 4). Die Bildungsgeschwindigkeit des 448 nm-Komplexes bleibt hingegen unbeeinflußt (Fig. 4). In ähnlicher Weise steigert n-Octylamin die Geschwindigkeit der enzymatischen C-Oxygenierung des N,N-Dimethylanilins ohne die N-Oxygenierungsreaktion wesentlich zu beeinflussen (Tabelle I).

## 7. Einfluß der Enzyminduktion auf die Bildung der Cytochrom P-450-Produkt-Addukte und die enzymatische C- und N-Oxygenierung von N,N-Dimethylanilin

Wir verglichen letztlich die Fähigkeit von P-450 und P-448, welches durch Vorbehandlung von Kaninchen mit Phenobarbital bzw. Methylcholanthren gewonnen wurde, Produkt-Addukte des N,N-Dimethylanilins zu bilden bzw. C- und N-Oxygenierung des Arylamins zu katalysieren.

Aus Fig. 3 geht hervor, daß Vorbehandlung von Kaninchen mit Phenobarbital sowohl die initiale Bildungsgeschwindigkeit als auch das Ausmaß der Bildung des 424 nm-Komplexes stimuliert. Die Bildungsgeschwindigkeit der 448 nm-Absorptionsbande bleibt unbeeinflußt, die Höhe der Bande wird jedoch erheblich vermindert (Fig. 3). Im Gegensatz zu diesen Befunden beschleunigt Phenobarbitalvorbehandlung von Versuchstieren die Bildung von 450 nm-Metabolitkomplexen aus primären Alkyl- und Arylaminen (Franklin, 1977).

Vorbehandlung der Kaninchen mit 3-Methylcholanthren hat eine stark verminderte 424 nm-Komplexbildung zur Folge (Fig. 3). Der einmal gebildete Komplex ist über einen längeren Zeitraum relativ stabil. Durch Vorbehandlung der Tiere mit dem polycyklischen Kohlenwasserstoff wird die Bildung des 448 nm-Metabolitkomplexes nahezu vollständig unterdrückt (Fig. 3).

Die Auswirkung der Enzyminduktion auf die Entwicklung der spektralen Änderungen gleicht der auf die enzymatische C- und N-Oxygenierung des N,N-Dimethylanilins. So steigert Vorbehandlung der Kaninchen mit Phenobarbital die Geschwindigkeit der C-Oxygenierung des Amins, während die Geschwindigkeit der N-Oxygenierung vermindert wird; 3-Methylcholanthrenvorbehandlung verringert die Geschwindigkeit beider Reaktionen (Tabelle I).

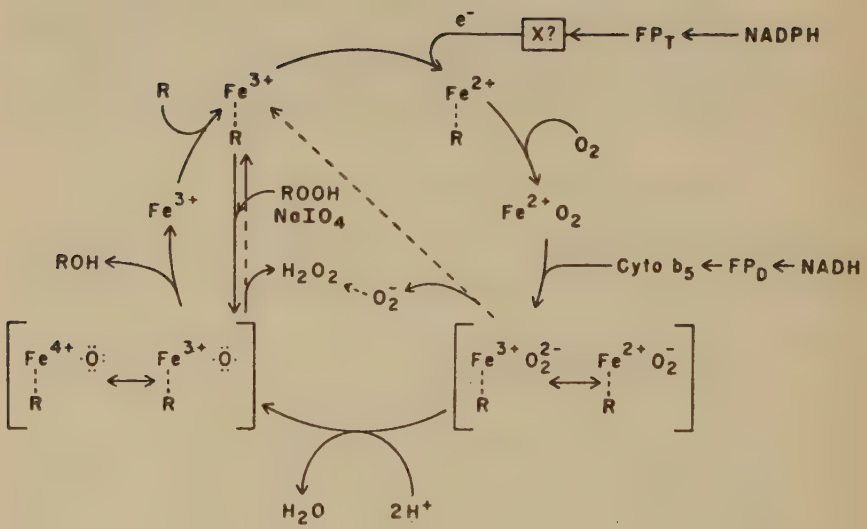



Fig. 1

Metabolischer Zyklus der Substratoxygenierung am Cytochrom P-450 System

Die einzelnen Symbole bedeuten: Fe = Hämeisen des Cytochrom P-450; R = zu oxygenierendes Substrat; $FP_T$ = Cytochrom c (P-450) Reduktase; $FP_D$ = Cytochrom $b_5$ Reduktase; ROOH = organisches Hydroperoxid.

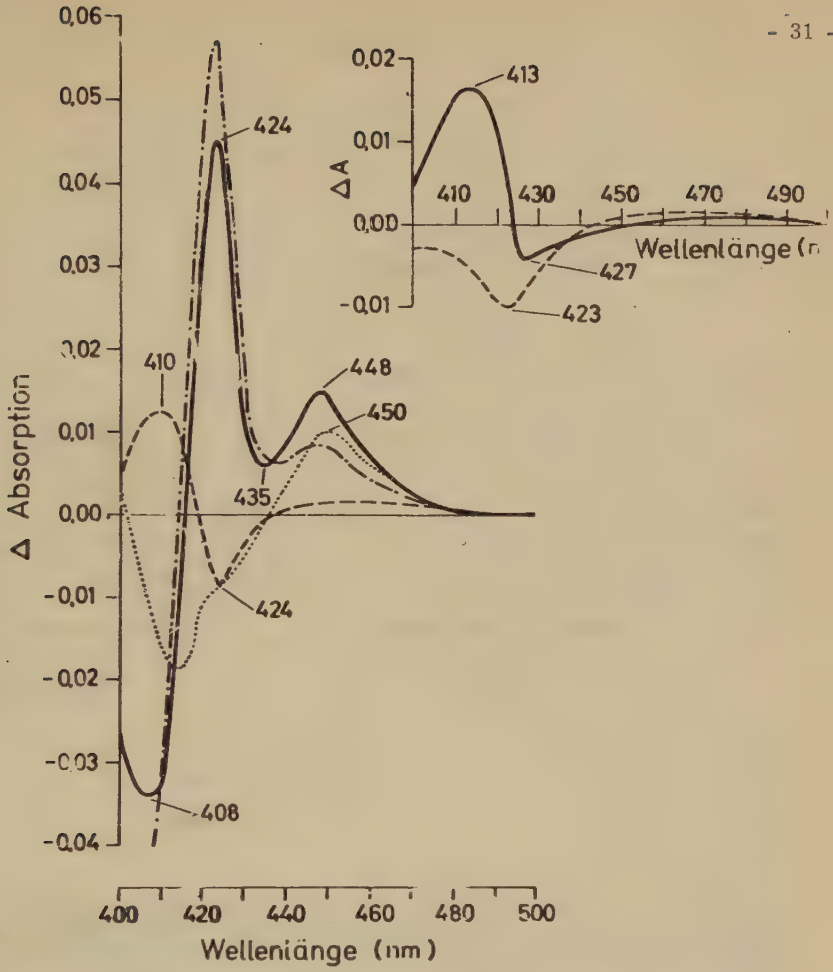
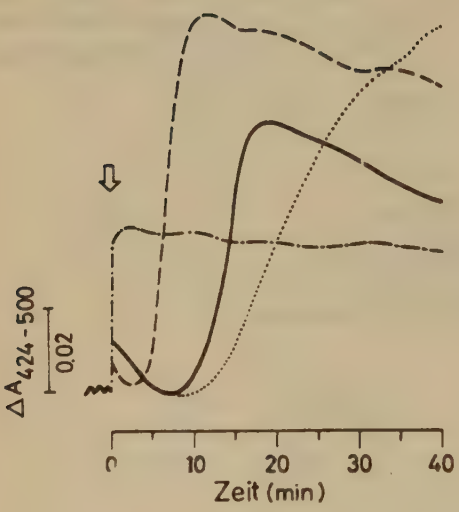



Fig. 2

Die Entstehung spektraler Änderungen während des oxidativen Metabolismus von N,N-Dimethylanilin durch partiell gereinigtes Cytochrom P-450

Die Ansätze enthielten 4.36 µM Cytochrom P-450 aus Kaninchenleber und NADPH-generierendes System in 0.15 M $KH_2PO_4/Na_2HPO_4$ Puffer, pH 7.4. Nach Schreibung der Basislinie wurde der Probeküvette N,N-Dimethylanilin zu einer Endkonzentration von 1.79 mM hinzugefügt, und das Differenzspektrum 0.5 min (----), 15 min (———) und 62 min (....) nach Substratzusatz gemessen. Der Einfluß von Katalase (1700 Einheiten/ml Ansatz) auf die spektralen Änderungen wurden ebenfalls untersucht (-..-). Die durch N,N-Dimethylanilin unter aeroben Bedingungen in Abwesenheit von NADPH (———) bzw. unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von NADPH (----) verursachten spektralen Änderungen sind im Nebenbild dargestellt. Alle Spektren wurden 15 min nach Zugabe des Arylamins gemessen.



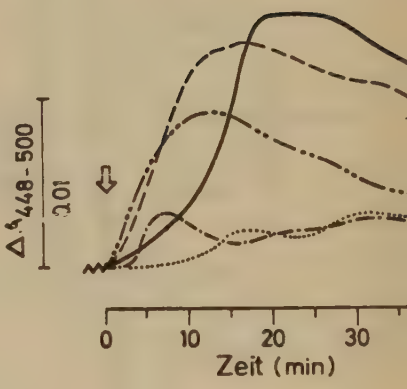




Fig. 3

Beeinflussung der Bildung der Cytochrom P-450-Produkt-Addukte des N,N-Dimethylanilins durch Vorbehandlung der mischfunktionellen Oxygenase mit organischen Lösungsmitteln und Induktoren

Cytochrom P-450, welches aus unbehandelten (——), mit Butanol/Aceton extrahierten (....) oder mit Phenobarbital (----) bzw. 3-Methylcholanthren (-.-.-) induzierten Kaninchenlebermikrosomen gewonnen wurde, wurde mit 0.15 M $KH_2PO_4/Na_2HPO_4$ Puffer, pH 7.4, zu einer Endkonzentration von 4.36 nmol/ml Ansatz verdünnt und mit NADPH-generierendem System versetzt. Versuchsansätzen, die mit Lösungsmitteln behandeltes Cytochrom P-450 enthielten, wurden zusätzlich Liposomen (0.5 mg/ml Ansatz) hinzugefügt (-..-). Die Gemische wurden gleichmäßig auf zwei Küvetten verteilt. Nach Zugabe von N,N-Dimethylanilin zur Probeküvette (Endkonzentration 1.79 mM) wurden die Absorptionsänderungen bei 424 nm und 448 nm relativ zu denen bei 500 nm gemessen, und als Funktion der Zeit aufgetragen.

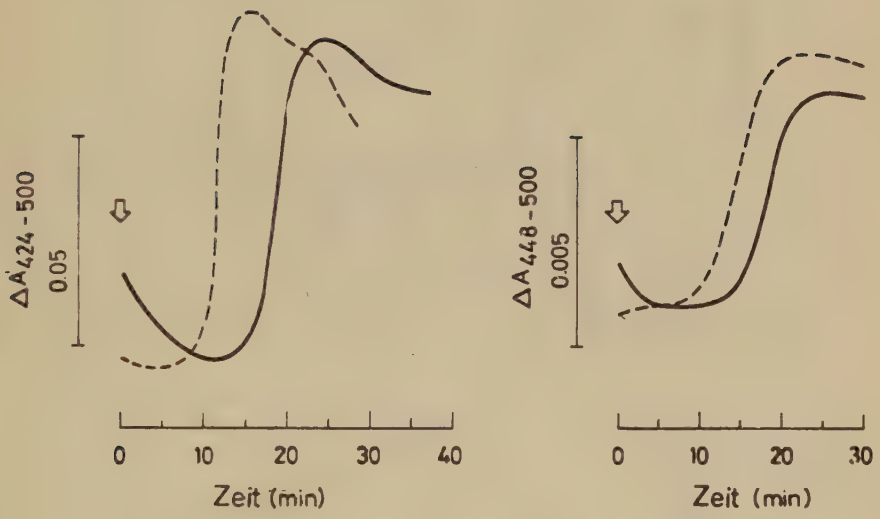



Fig. 4

Der Einfluß von n-Octylamin auf die Bildung der Cytochrom P-450-Produkt-Addukte des N,N-Dimethylanilins

Die experimentellen Bedingungen gleichen den in der Legende zu Fig. 2 beschriebenen. Das Reaktionsgemisch enthielt zusätzlich n-Octylamin (Endkonzentration 0.1 mM) (----). Kontrollmessungen in Abwesenheit von n-Octylamin wurden ebenfalls durchgeführt (——).

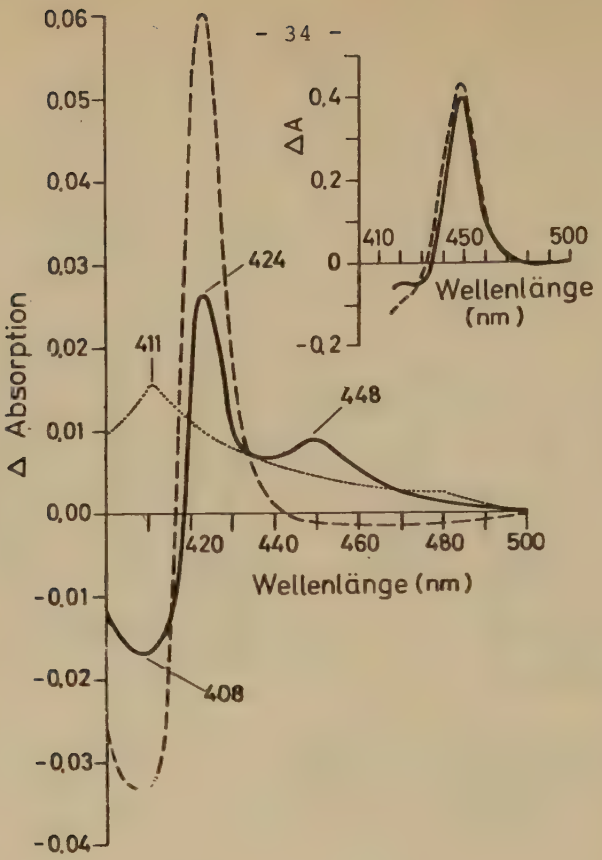



Fig. 5

Der Einfluß von Kaliumferricyanid und Natriumdeoxycholat auf die Bildung der Cytochrom P-450-Metabolitkomplexe des N,N-Dimethylanilins

Die experimentellen Bedingungen gleichen den in der Legende zu Fig. 2 beschriebenen. Nach maximaler Entwicklung der 424- und 448 nm-Absorptionsbande (———) wurde entweder Kaliumferricyanid (----; Endkonzentration 50µM) oder Natrium deoxycholat (....; Endkonzentration 6.0 mM) zum Inhalt der Probe- und Referenzküvette hinzugefügt, und das Differenzspektrum 1 min später gemessen.

Nebenbild: Nach maximaler Entwicklung der metabolischen Komplexe wurde das Cytochrom P-450 durch Zugabe von Kaliumferricyanid (Endkonzentration 50µM) zu beiden Küvetten vollständig oxidiert. Anschließend wurde der Inhalt der Probeküvette 1 min mit CO begast. Nach vollständiger Reduktion des Cytochroms mittels Natriumdithionit wurde das Differenzspektrum des Carbonylkomplexes gemessen (----). Kontrollmessungen in Abwesenheit von N,N-Dimethylanilin wurden gleic zeitig durchgeführt (———).

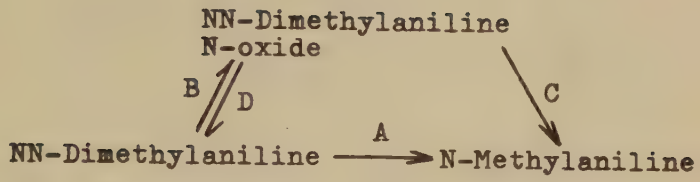



Fig. 6

Schema zum Metabolismus des N,N-Dimethylanilins durch mikrosomale mischfunktionelle Oxygenasen

Es bedeutet: (A) α-C-Oxygenierung; (B) N-Oxidation; (C) Demethylierung des N-Oxidationsprodukts unter Formaldehydabspaltung; (D) Reduktion des N-Oxidationsprodukts zur Muttersubstanz.

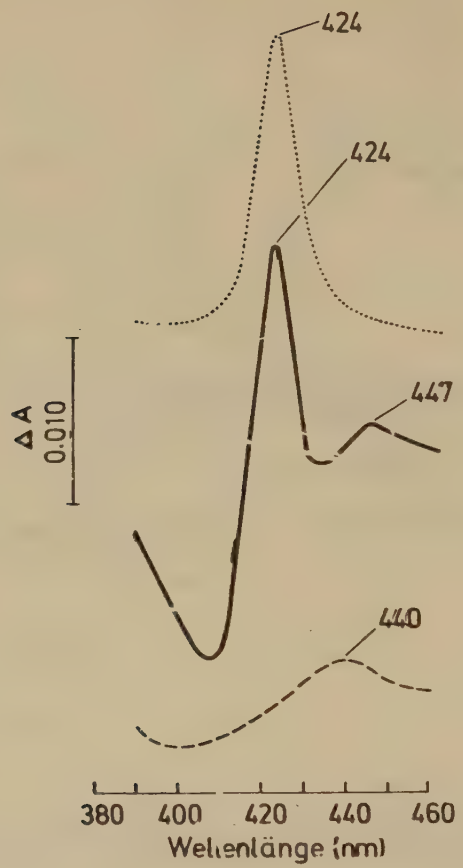



Fig. 7

Die Bildung spektraler Komplexe durch mögliche Metabolite des N,N-Dimethylanilins

Die Versuchsansätze enthielten 4.36 µM Cytochrom P-450, 10 mM N,N-Dimethylanilin und NADPH-generierendes System in 0.15 M $KH_2PO_4/Na_2HPO_4$ Puffer, pH 7.4. N,N-Dimethylanilin-N-Oxid (Endkonzentration 0.1 mM) wurde der Probeküvette zugefügt, und das Differenzspektrum 4 (----) und 20 min (———) später gemessen.

In einer anderen Versuchsreihe wurde N-Methylanilin (Endkonzentration 1.0 mM) der Probeküvette zugesetzt, und das Spektrum aufgezeichnet (....).

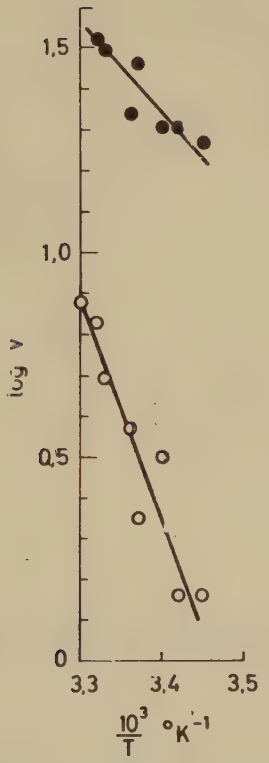



Fig. 8

Der Einfluß der Temperatur auf die Bildungsgeschwindigkeit der Cytochrom P-450-Produkt-Addukte

Die experimentellen Bedingungen gleichen den in der Legende zu Fig. 2 beschriebenen. Die initialen Bildungsgeschwindigkeiten (ν) des 424 nm-Komplexes (●) und des 448 nm-Komplexes (o) wurden mit Hilfe der Steigungsgeraden von Kurven errechnet, wie sie ähnlich in Fig. 3 dargestellt sind; die Werte wurden als Funktion der reziproken Temperatur aufgetragen. ν gibt die optische Änderung pro Minute an.

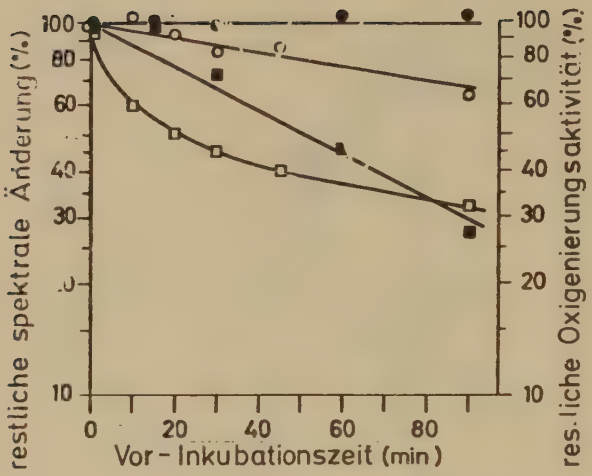



Fig. 9

Auswirkung der Vorinkubation von Cytochrom P-450 in Abwesenheit von NADPH auf die Bildung der 424- und 448 nm-Absorptionsbande, und die enzymatische C- und N-Oxygenierung des N,N-Dimethylanilins

Gelöstes Cytochrom P-450 wurde mit 0.15 M $KH_2PO_4$/$Na_2HPO_4$ Puffer, pH 7.4, zu einer Endkonzentration von 4.36 nmol/ml Ansatz verdünnt, und in Abwesenheit von NADPH-generierendem System bei 37°C jeweils für die in der Abbildung angegebenen Zeiten vorinkubiert. Am Ende der jeweiligen Vorinkubationsperiode wurde einem Teil des Ansatzes NADPH-generierendes System zugesetzt; dieser wurde dann zur spektrophotometrischen Bestimmung der Addukt-Bildung aus N,N-Dimethylanilin verwendet. Der andere Teil wurde zur Bestimmung der enzymatischen C- und N-Oxygenierung des Arylamins benützt. Die Symbole bedeuten: (●), 424 nm-Komplexbildung aus N,N-Dimethylanilin; (■), 448 nm-Komplexbildung aus N,N-Dimethylanilin; (o), enzymatische C-Oxygenierung des N,N-Dimethylanilins; (□), enzymatische N-Oxygenierung des N,N-Dimethylanilins. Die Punkte stellen Mittelwerte aus drei bis vier Versuchen dar.

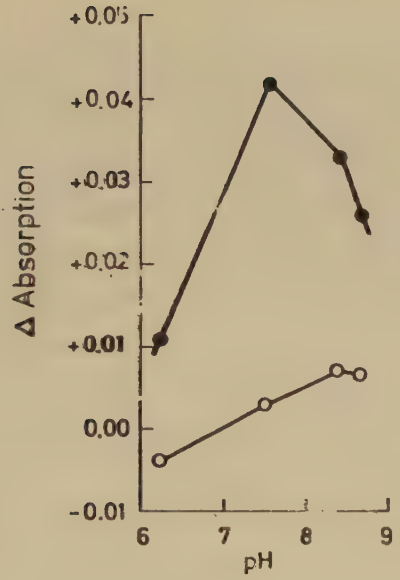



Fig. 10

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Bildung der Cytochrom P-450-Produkt-Addukte

Die experimentellen Bedingungen gleichen den in der Legende zu Fig. 2 beschriebenen. Verwendete Puffersysteme: 0.15 M $KH_2PO_4/Na_2HPO_4$ im Bereich von pH 6 bis 8; 0.15 M Tris/HCl im Bereich von pH 8 bis 9. Die Symbole bedeuten: (●), 424 nm-Komplexbildung aus N,N-Dimethylanilin; (o), 448 nm-Komplexbildung aus N,N-Dimethylanilin. Die Punkte stellen die Mittelwerte aus drei Versuchen dar.

Tabelle I

Oxidativer Metabolismus von N,N-Dimethylanilin durch partiell solubilisiertes Cytochrom P-450 aus Kaninchenleber: Der Einfluß unterschiedlicher Behandlung des Systems auf die enzymatische C- und N-Oxygenierung des Arylamins

| Vorbehandlung | C-Oxygenierung von N,N-Dimethyl-anilin (mol pro min und mol Hämo-protein) | N-Oxygenierung von N,N-Di-methylanilin (mol pro min und mol Hämoprotein) |
|---|---|---|
| Keine | 1.25 ± 0.11 | 3.15 ± 0.18 |
| Zugabe von n-Octylamin (Endkonzentration 0.1 mM) zum Versuchsansatz | 2.42 ± 0.10 | 3.29 ± 0.27 |
| Extraktion der Enzym-präparationen mit organi-schen Lösungsmitteln | 0.79 ± 0.07 | 0.82 ± 0.15 |
| Induktion der Kanin-chen mit Phenobarbital | 4.17 ± 0.18 | 0.96 ± 0.06 |
| Induktion der Kanin-chen mit 3-Methylcholanthren | 0.39 ± 0.09 | 0.93 ± 0.09 |

Die Inkubationsansätze hatten folgende Zusammensetzung: 1.43 µM Cytochrom P-450 oder P-448, NADPH-generierendes System und 1.0 mM N,N-Dimethylanilin in 0.15 M $KH_2PO_4$/ $Na_2HPO_4$ Puffer, pH 7.4. Die Reaktionsansätze wurden 10 min bei 37°C inkubiert. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte ± S.E. aus 3 - 6 Versuchen dar.

## D. Diskussion

Der Einfluß von Temperatur, Wasserstoffionenkonzentration, n-Octylamin, Extraktion der Enzympräparationen mit organischen Lösungsmitteln, und Vorbehandlung von Kaninchen mit Enzyminduktoren auf die Bildung der, während des oxidativen Metabolismus von N,N-Dimethylanilin durch partiell gereinigtes Cytochrom P-450 beobachteten spektralen Änderungen, wurde mit dem auf die enzymatische C- und N-Oxygenierung des Arylamins verglichen. Jede Änderung der Kinetik der Bildung des 424 nm-Metabolitkomplexes korreliert mit einer entsprechenden Änderung in der enzymatischen C-Oxygenierung des N,N-Dimethylanilins. Desgleichen entspricht jede Änderung in der Bildung des 448 nm-Cytochrom P-450-Produkt-Addukts einer gleichsinnigen Änderung in der katalytischen N-Oxygenierung des Arylamins (Fig. 3, 4, 9, 10 und Tabelle I). Aus diesem Verhalten kann geschlossen werden, daß die 424 nm-Absorptionsbande einer spektral fassbaren Zwischenstufe in der oxidativen C-Oxygenierung des N,N-Dimethylanilins entspricht, während die Bildung des 448 nm-Komplexes wahr-

scheinlich auf der Bindung eines Metaboliten an Cytochrom P-450 beruht, der während der N-Oxygenierung des tertiären Amins entsteht. Diese Folgerung wird durch die Tatsache gestützt, daß Zusatz von N-Methylanilin bzw. N,N-Dimethylanilin-N-Oxid zu aeroben Inkubationsansätzen von Cytochrom P-450 in Gegenwart von NADPH-generierendem System Differenzspektren ergibt, die Komponenten jenes Spektrums sind, welches während des oxidativen Metabolismus der Muttersubstanz beobachtet wird (Fig. 7).

Nach allgemeiner Auffassung müssen tertiäre Alkylamine metabolisch zu sekundären Aminen umgewandelt werden, bevor die Bildung von 455 nm-Metabolitkomplexen durch N-Hydroxylierung stattfinden kann (Franklin, 1977). Im Gegensatz dazu scheint die N-Dealkylierung des N,N-Dimethylanilins kein obligatorischer Zwischenschritt bei der Bildung des 448 nm-Komplexes zu sein, da N-Methylanilin während des NADPH-abhängigen Metabolismus kein derartiges Differenzspektrum bildet (Fig. 7).

Nach Ansicht verschiedener Autoren werden die, während des Metabolismus einer Vielzahl von Aminsubstraten gebildeten N-oxidierten Zwischenstufen mittels freier Elektronen ihrer Stickstoffatome an das Hämeisen des Cytochrom P-450 gebunden (James und Franklin, 1975). Unter der Annahme, daß der hier beschriebene 448 nm-Metabolitkomplex tatsächlich durch Bindung einer N-oxidierten Zwischenstufe des N,N-Dimethylanilins an Ferrocytochrom P-450 entsteht, ist eine direkte Wechselwirkung des Stickstoffatoms des Amins mit dem Hämeisen unwahrscheinlich, da der Stickstoff im N-Oxid über keine freien Elektronen verfügt. Es besteht jedoch die Möglichkeit der Bindung des N-oxidierten Metaboliten an das Hämeisen über freie Elektronen des Sauerstoffatoms; solches wurde für die Fe(II)-Komplexe einer Reihe von N-Oxiden heterocyklischer Amine gefunden (Nicholls, 1973). Diese Annahme wird durch die Bildung einer 440 nm-Absorptionsbande nach Zusatz von N,N-Dimethylanilin-N-Oxid zu NADPH-reduziertem Cytochrom P-450 gestützt (Fig. 7), welche unmittelbar mit der 440 nm-Soret-Bande des Oxy-Ferrocytochrom P-450-Komplexes vergleichbar ist (Estabrook et al., 1971). Die Bildung eines derartigen Komplexes scheint im Vergleich zu der des 424 nm-Komplexes stärkere thermische Aktivierung zu erfordern (Fig. 8).

Schließlich stützen unsere Ergebnisse die Vermutung, daß Cytochrom P-450 an der N-Oxygenierung des N,N-Dimethylanilins beteiligt ist. Dies scheint im Hinblick auf die Entdeckung einer Flavoprotein-Aminoxidase (EC 1.14.13.8), welche die N-Oxygenierung einer Vielzahl sekundärer und tertiärer Amine katalysiert, von besonderem Interesse (Ziegler und Mitchell, 1972). Die Möglichkeit der Bildung des 448 nm-Komplexes durch Verunreinigung der Hämoproteinpräparationen mit Aminoxidase und nachfolgender Bindung des durch letztere gebildeten N-Oxids an Cytochrom P-450 kann aus folgenden Gründen ausgeschlossen werden: (a) 1-(1-Naphthyl)-2-thioharnstoff, ein selektiver Hemmstoff der Aminoxidase (Ziegler und Mitchell, 1972), beeinflußt die enzymatische N-Oxygenierung des N,N-Dimethylanilins kaum; (b) n-Octylamin, ein selektiver Aktivator der Aminoxidase (Ziegler und Mitchell, 1972) stimuliert die N-Oxygenierung des Amins nicht (Tabelle I); (c) Vorbehandlung von Kaninchen mit Phenobarbital oder 3-Methylcholanthren vermindert die Geschwindigkeit der N-Oxidbildung aus N,N-Dimethylanilin erheblich (Tabelle I), obwohl keiner dieser Induktoren die Biosynthese der Aminoxidase zu beeinflussen vermag (Masters und Ziegler, 1971; Prough und Ziegler, 1977).

## E. Zusammenfassung

Wir fanden, daß der oxidative Metabolismus des N,N-Dimethylanilins durch partiell gereinigtes Cytochrom P-450 aus Kaninchenleber mit der Bildung eines 424- und 448 nm-Produkt-Addukts des Hämoproteins verbunden ist. Aus dem Einfluß von Temperatur, Wasserstoffionenkonzentration, n-Octylamin, Extraktion der Enzympräparationen mit organischen Lösungsmitteln, und Vorbehandlung der Tiere mit Enzyminduktoren auf die Bildung der spektralen Komplexe einerseits, und die enzymatische C- und N-Oxygenierung des tertiären Arylamins andererseits wird geschlossen, daß die 424 nm-Absorptionsbande durch Bindung eines während der C-Oxygenierung des Amins gebildeten Zwischenprodukts an Cytochrom P-450 entsteht, während die Bildung des 448 nm-Komplexes in engem Zusammenhang mit der N-Oxygenierung des Arylamins steht. N-Dealkylierung des N,N-Dimethylanilins scheint kein obligatorischer Zwischenschritt bei der Bildung des 448 nm-Komplexes zu sein.

Wir nehmen an, daß der 448 nm-Produkt-Komplex durch Bindung des N-oxidierten Zwischenprodukts über freie Elektronen des Sauerstoffatoms an das Hämeisen des Cytochroms entsteht. Diese Wechselwirkung scheint stärkere thermische Aktivierung als die Bildung des 424 nm-Komplexes zu erfordern. Der 448 nm-Komplex des Cytochroms ist in der oxidierten Form oder in Anwesenheit von Natriumdithionit unstabil.

F. Literaturverzeichnis

Archakov, A.J., Devichensky, V.M. und Karjakin, A.V.:
Electron transfer in the membranes of endoplasmic reticulum - Participation of Cytochrome $b_5$ in the NADPH oxidation reaction. The evidence for two Cytochrom $b_5$ in liver microsomes.
Arch.Biochem.Biophys. 166, 295 (1975)

Autor, A., Kaschnitz, R.M., Heidema, J.K. and Coon, M.J.:
Sedimentation and other properties of the reconstituted liver microsomal mixed-function oxidase system containing Cytochrome P-450 reduced Triphosphopyridine nucleotide-Cytochrom P-450 reductase, and Phosphatidylcholine.
Mol.Pharmacol. 9, 93 (1973)

Boyland, E., Dukes, C.E. and Grover, P.L.:
Carcinogenicity of 2-Naphtylhydroxylamine and 2-Naphtylamine.
Brit.J.Cancer 17, 79 (1963)

Buenning, M.K. and Franklin, M.R.:
SKF 525-A inhibition, induction, and 452-nm complex formation.
Drug Metabol.Dispos., 4, 244 (1976)

Conney, A.H.:

Pharmacological implications of microsomal enzyme induction.

Pharmacol.Rev. 19, 317 (1967)

Devereux, T.R. and Fouts, J.R.:

N-oxidation and demethylation of N,N-Dimethylaniline by rabbit liver and lung microsomes effects of age and metals.

Chem.-Biol.Interact. 8, 91 (1974)

Duppel, W., Lebeault, J.-M. and Coon, M.J.:

Properities of a yeast cytochrome P-450-containing enzyme system with catalyzes the hydroxylation of fatty acids, alkanes and drugs.

Eur.J.Biochem. 36, 583 (1973)

Ebel, R.E., O'Keeffe, D.H. and Peterson, J.A.:

Nitric oxide complexes of cytochrome P-450.

FEBS Lett. 55, 198 (1975)

Ellin, A., Jakobson, S., Schenkman, J.B. and Orrenius, S.:

Cytochrome P-450 of rat kidney cortex microsomes: Its involvement in fatty acid ω and (ω-1) hydroxylation.

Arch.Biochem.Biophys. 150, 64 (1972)

Estabrook, R.W., Cooper, D.Y. and Rosenthal, O.:
The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid $C_{21}$-hydroxilase system of the adrenal cortex.
Biochem.Z. 338, 741 (1963)

Estabrook, R.W., Hildebrandt, A.G., Baron, J., Netter, K.J. and Leibmann, K.:
A new spectral intermediate associated with cytochrome P-450 function in liver microsomes.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 42, 132 (1971)

Estabrook, R.W., Matsubara, T., Mason, J., Werringloer, J. and Baron, J.:
Studies on the molecular function of Cytochrome P-450 during drug metabolism.
Drug.Metabol.Dispos. 1, 98 (1973)

Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H.:
A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.
J.Biol.Chem. 226, 497 (1957)

Franklin, M.R.:
The enzymic formation of a methylenedioxyphenyl derivate exhibiting an isocyanide-like spectrum with reduced cytochrome P-450 in hepatic microsomes.

Xenobiotica, 1, 581 (1971)

Franklin, M.R.:

The influence of cytochrome P-450 induction on the metabolic formation of 455 nm complexes from amphetamines.

Drug Metabol.Dispos. 2, 321 (1974)

Franklin, M.R.:

The formation of a 455 nm complex during cytochrom P-450-dependent N-hydroxy-amphetamine metabolism.

Mol.Pharmacol. 10, 975 (1974)

Franklin, M.R.:

A new class of inhibitory cytochrome P-450 complexes formed during metabolism "A comparison with amphetamine and SKF 525-A type complexes.

Chem.-Biol.Interact. 14, 337 (1976)

Franklin, M.R.:

Inhibition of mixed-function oxydations by substrates forming reduced cytochrome P-450 metabolic-intermediate complexes.

Pharmacol.Ther.A2, 227 (1977)

Garfinkel, D.:

Studies on pig liver microsomes.

I. Enzymic and pigment composition on different

microsomal fractions.
Arch.Biochem. 77, 493 (1958)

Gillette, J.R.:
Biochemistry of drug oxidation and reduction by enzymes in hepatic endoplasmic reticulum.
Advances in Pharmacol. 4, 219 (1966)

Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M.:
Determination of serum protein by means of the biuret reaction.
J.Biol.Chem. 177, 751 (1949)

Grein, H., Czygan, P.A., Garro, J. and Hutterer, F.
Cytochrome P-450 in the activation and inactivation of Carcinogenes.
Advances in exp.medicine and biology 58, 103 (1975)

Gutmann, H.R. and Erickson, R.R.:
The conversion of the carcinogen N-hydroxy-2-fluorenyl-acetamide to o-aminophenols by rat liver in vitro.
J.biol.Chem. 244, 1729 (1969)

Hildebrandt, A. and Estabrook, R.W.:
Evidence for the participation of cytochrome $b_5$ in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions.
Arch.Biochem.Biophys. 143, 66 (1971)

Hildebrandt, A., Remmer, H. and Estabrook, R.W.:
Cytochrome P-450 of liver microsomes - one pigment or many.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 30, 607 (1968)

Hlavica, P.:
Interaction of oxygen and aromatic amines with hepatic microsomal-function oxidase.
Biochim.Biophys.Acta 273, 318 (1972)

Hlavica, P. and Kehl, M.:
Effect of carbon monoxide on the N-oxidation of N,N-dimethylaniline.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 355, 1508 (1974)

Hlavica, P. and Kehl, M.:
Studies on the mechanism of hepatic microsomal N-oxide formation.
The role of cytochrome P-450 and mixed-function amine oxidase in the N-oxidation of N,N-dimethylaniline.
Biochem.J. 164, 487 (1977)

Ichikawa, Y., Yamano, T. and Fujishima, H.:
Relationship between the interconversion of cytochrome P-450 and P-420 and its activities in hydroxylations

and demethylations by P-450 oxidase systems.
Biochim.Biophys.Acta 171, 32 (1969)

Imai, Y. and Sato, R.:
Substrate interaction with hydroxylase system in liver microsomes.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 22, 620 (1966)

Jagow, R., Kampffmeyer, H. and Kiese, M.:
The preparation of microsomes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.
Pharmacol. 251, 73 (1965)

James, R.C. and Franklin, M.R.:
Comparisons of the formation of cytochrome P-450 complexes absorbing at 455 nm in rabbit and rat microsomes.
Biochem.Pharmacol. 24, 835 (1975)

Jansson, J. and Schenkman, J.B.:
Influences of substrates of different microsomal electron transfer pathways on the oxidation - reduction kinetics of microsomal cytochrome $b_5$.
Arch.Biochem.Biophys. 185, 251 (1978)

Jefcoate, C.R.E. and Gaylor, J.L.:
Ligand interactions with hemoprotein P-450.

II. Influence of phenobarbital and methylcholanthrene induction processes on P-450 spectra.
Biochemistry 8, 3464 (1969)

Jefcoate, C.R.E., Gaylor, J.L. and Calabrese, R.L.:
Ligand interactions with cytochrome P-450
I. Binding of primary amines.
Biochemistry 8, 3455 (1969)

Jonen, H.G., Hüthewohl, B., Kahl, R. and Kahl, G.F.:
Influence of pyridine and some pyridine derivatives on spectral properities of reduced microsomes and on microsomal drug metabolizing activity.
Biochem.Pharmacol. 23, 1319 (1974)

Jonsson, J. and Lindeke, B.:
On the formation of cytochrome P-450 product complexes during the metabolism of phenyl alkylamines.
Acta Pharm.Snec. 13, 313 (1976)

Katagiri, M., Ganguli, B.N. and Gunsalus, J.C.:
A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation.
J.Biol.Chem. 243, 3543 (1968)

Kawalek, J.C., Levin, W., Ryan, D. and Lu, A.Y.H.:
Reconstituted liver microsomal enzyme system that

hydroxylates drugs, other foreign compounds and endogenous substrates.
IX. The formation of a 455 nm metabolite-cytochrome P-450 complex.
Drug.Metabol.Dispos. 4, 190 (1976)

Kiese, M., Reinwein, D. and Waller, H.D.:
Die Hämoglobinbildung durch Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol in roten Zellen in vitro.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 210, 393 (1950)

Klingenberg, M.:
Pigments of rat liver microsomes.
Arch.Biochem. 75, 376 (1958)

Kriek, E.:
On the interaction of N-2-fluorenylhydroxylamine with nucleic acids in vitro.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 20, 793 (1965)

Kupfer, D. and Orrenius, S.:
Characteristics of guinea pig liver and adrenal monooxygenase systems.
Mol.Pharmacol. 6, 221 (1970)

Levin, W., Lu, A.Y.H., Ryan, D., West, S., Kuntzmann, R., and Conney, A.H.:
Partial purification and separation of multiple forms of cytochrome P-450 and cytochrome P-448 from rat liver microsomes.
Advances in exp. medicine and biology 58, 1 (1975)

Lu, A.Y.H. and Coon, M.Y.:
Role of hemoprotein P-450 in fatty acid co-hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes.
J.Biol.Chem. 243, 1331 (1968)

Lu, A.Y.H., West, S.B., Vore, M., Ryan, D. and Levin, W.:
Role of cytochrome $b_5$ in hydroxylation by a reconstituted cytochrom P-450-containing system.
J.Biol.Chem. 249, 6701 (1974)

Mansuy, D., Beaune, P., Chottard, J.C., Bartoli, J.F. and Gans, P.:
The nature of the "455 nm absorbing complex" formed during the cytochrome P-450 dependent oxidative metabolism of amphetamine.
Biochem.Pharmacol. 25, 609 (1976)

Mansuy, D., Duppel, W., Ruf, H.H. and Ulrich, V.:
Phosphines as ligands to microsomal cytochrome P-450.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 355, 1341 (1974)

Mansuy, D., Gans, P., Chottard, J.C. and Bartoli, J.F.:
Nitrosalkanes as Fe(II)Ligands in the 455 nm-absorbing cytochrome P-450 complexes formed from nitroalkanes in reducing conditions.
Europ.J.Biochem. 76, 607 (1977)

Mansuy, D., Nastainczyk, W. and Ullrich, V.:
The mechanism of halothane binding to microsomal cytochrome P-450.
Naunyn-Schmiedeberger's Arch.Pharmacol. 285, 315 (1974)

Mason, H.S.:
Mechanisms of oxygen metabolism.
Advances in Enzymol. 19, 79 (1957)

Masters, B.S.S., Williams, C.H. and Kamin, H.:
The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome c reductase from pig liver.
Methods Enzymol. 10, 565 (1968)

Masters, B.S.S. and Ziegler, D.M.:
The distinct nature and function of NADPH-cytochrome

c-reductase and the NADPH-dependent mixed-function amine oxidase of porcine liver microsomes.
Arch.Biochem.Biophys. 145, 358 (1971)

Meisenheimer, H.:
Optisch aktive Aminoxyde.
Justus Liebig's Annn.Chem. 385, 117 (1911)

Miller, E.C. and Miller, J.A.:
A mechanism of ortho-hydroxylation of aromatic amines in vitro.
Biochim.Biophys.Acta 40, 379 (1960)

Miller, J.A., Wyatt, C.S., Miller, E.C. and Hartmann, H.A.:
The N-hydroxylation of 4-actylaminobiphenyl by the rat and dog and the strong carcinogenicity of N-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl in the rat.
Cancer Res. 21, 1465 (1961)

Mitani, F. and Horie, S.:
Studies on cytochrome P-450; V. On the substrate-induced spectral change of cytochrome P-450 solubilized from bovine adrenocortical mitochondria.
J.Biochem. (Tokyo) 65, 269 (1969)

Morello, A., Bleecka, W. and Agosin, M.:
Cytochrome P-450 and hydroxylating activity of

microsomal preparations from whole houseflies.
Biochem.J. 124, 199 (1971)

Narashimulu, S., Cooper, D.Y. and Rosenthal, O.:
Spectrophotometric properities of a Triton-clarified steroid 21-hydroxylase system of adrenocortical microsomes.
Lif.Sci. 4, 2101 (1965)

Nastainczyk, W., Ruf, H.H. and Ullrich, V.:
Ligand binding of organic sulfides to microsomal cytochrome P-450.
Eur.J.Biochem. 60, 615 (1975)

Nastainczyk, W., Ruf, H.H. and Ullrich, V.:
Binding of thiols to microsomal cytochrom P-450.
Chem.-Biol.Interact. 14, 251 (1976)

Nicholls, D. in Comprehensive Inorganic Chemistry (Bailar, J.C., Emeleus, H.J., Nyholm, R. and Trotman-Dickenson, eds.), Vol. 3, p. 979, Pergamon Press Oxford (1973)

Nishibayashi, H., Omura, T. and Sato, R.:
The binding of ethyl isocyanide by hepatic microsomal hemoprotein.
Biochim.Biophys.Acta 118, 651 (1966)

Omura, T. and Sato, R.:

The carbon monoxide - binding pigment of liver microsomes.

I. Evidence for its hemoprotein nature.

J.Biol.Chem. 239, 2370 (1964)

Omura, T. and Sato, R.:

The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes.

II. Solubilisation, purification and properities.

J.Biol.Chem. 239, 2379 (1964 b)

Omura, T., Sanders, E., Estabrook, R.W., Cooper, D.Y. and Rosenthal, O.:

Isolation from adrenal cortex of a nonheme iron protein and a flavoprotein functional as a reduced triphosphopyridine nucleotide: Cytochrome P-450-reductase.

Arch.Biochem.Biophys. 117 , 660 (1966)

Peisach, J. and Mannering, G.J.:

A re-evaluation of the optical titrations of the 430 and 455 nm chromophores of ethylisocyanide complexes of mammilian hepatic cytochromes P-450.

Mol.Pharmacol. 11, 818 (1975)

Philpot, R.M. and Hodgson, E.:
The effect of piperonyl butoxide concentration of the formation of cytochrome P-450 difference spectra in hepatic microsomes from mice.
Mol.Pharmacol. 8, 204 (1972)

Prough, R.A. and Ziegler, D.M.:
The relative participation of liver microsomal amine oxidase and cytochrome P-450 in N-demethylation reactions.
Arch.Biochem.Biophys. 180, 363 (1977)

Rein, H., Ristan, O., Friedrich, J., Jänig, G. and Ruckpaul, K.:
Evidence for the existence of a high spin-low spin equilibrium in liver microsomal cytochrome P-450.
FEBS Lett. 75, 19 (1977)

Rich, P.R. and Bendall, D.S.:
Cytochrome components of plant microsomes.
Eur.J.Biochem. 55, 333 (1975)

Saprin, A.N., Ramseyer, J., McConn.J. and Piette, L.H.:
Electron spin resonance and optical spectra of the complexes of dialkylnitrosoamines with cytochrome P-450.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 77, 789 (1977)

Schrittmatter, C.F. and Umberger, F.T.:
Oxidative enzyme components of avian liver microsomes changes during embryonic development and the effects of phenobarbital administration.
Biochim.Biophys.Acta 180, 18 (1969)

Strobel, H.W., Lu, A.Y.H., Heidema, J. and Coon, M.J.:
Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of hemoprotein P-450 and in fatty acids hydrocarbon, and drug hydroxylation.
J.Biol.Chem. 245, 4851 (1970)

Szarkowska, L. and Klingenberg, M.:
On the role of ubiquinone in mitochondria spectrophotometric and chemical measurements of its redox reactions.
Biochem.Z. 338, 674 (1963)

Takesue, Y. and Sato, R.:
Biochemical and morphological characterization of microvilli isolated from intestinal mucosal cells.
J.Biochem. (Tokio) 64, 885 (1968)

Ullrich, V. and Schnabel, K.H.:
Formation and binding of carbanions by cytochrome P-450 of liver microsomes.
Drug Metabol.Dispos. 1, 176 (1973)

Vore, M., Lu, A.Y.H., Kuntzman, R. and Conney, A.H.:
Organic solvent extraction of liver microsomal lipid.
II. Effect on the metabolism of substrates and binding spectra of cytochrome P-450.
Mol. Pharmacol. 10, 963 (1974)

Werringloer, J. and Estabrook, R.W.:
Heterogeneity of liver microsomal cytochrome P-450: The spectral characterization of reactants with reduced cytochrome P-450.
Arch.Biochem.Biophys. 167, 270 (1975)

Willi, P. and Bickel, M.H.:
Liver metabolic reactions: Tertiary amine N-dealkylation, tertiary amine N-oxidation, N-oxide-recution, and N-oxide N-dealkylation.
II. N,N-dimethylaniline.
Arch.Biochem.Biophys. 156, 772 (1973)

Yoschida, T. and Kikuchi, G.:
Sequence of the reaction of heme catabolism catalyzed by the microsomal heme oxygenase system.
FEBS Letters 48, 256 (1974)

Ziegler, D.M. and Mitchell, C.H.:
Microsomal oxidase IV: Properities of a mixed -

function amine oxidase isolated from pig liver microsomes.
Arch.Biochem.Biophys. 150, 116 (1972)

Herrn Prof. Dr. med. P. Hlavica möchte ich für die Überlassung des Themas, die Unterstützung und wissenschaftliche Beratung, Frau Dr. M. Kehl und Frau J. Mietaschk für die freundliche Unterweisung bei den experimentellen Arbeiten danken.

LEBENSLAUF

Ich, Gerda Aichinger, wurde am 3. März 1951 in München als Tochter des Omnibusfahrers Max Aichinger und seiner Ehefrau Thekla, geb. Reil, geboren. Von 1957 bis 1964 besuchte ich in München die Volksschule, und anschließend von 1964 bis 1968 die Realschule der Englischen Fräulein in Berg am Laim. Nach dem Besuch einer Übergangsklasse der Salvatorrealschule, trat ich 1969 an das Sophie-Scholl-Gymnasium über, und legte dort 1972 das Abitur ab. Im Wintersemester 1972/73 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Medizinstudium.

Im Sommer 1974 legte ich die Ärztliche Vorprüfung, im Sommer 1975 den ersten Teil, im Sommer 1977 den zweiten Teil und im Winter 1978 den dritten Teil der Ärztlichen Prüfung in München ab.

Seit April 1979 arbeite ich als Assistenzärztin in der Radiologischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses Ingolstadt.